

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LAIS GUIMARÃES ALARÇA

USO DA LUTEÍNA EM DIETAS PARA CÃES

CURITIBA

2012

LAIS GUIMARÃES ALARÇA

USO DA LUTEÍNA EM DIETAS PARA CÃES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Sebastião A. Borges

Coorientador: Prof. Dr. Alex Maiorka


CURITIBA

2012

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**PARECER**

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada “USO DA LUTEÍNA EM DIETAS PARA CÃES” apresentada pela Mestranda LAIS GUIMARÃES ALARÇA declara ante os méritos demonstrados pela Candidata, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou a candidata Ailene da para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 29 de Março de 2012


Professor Dr. Sebastião Aparecido Borges
Presidente/Orientador


Professor Dr. Alex Maiorka
Membro


Professor Dr. Everton Krabbe
Membro



Universidade Federal do Paraná
Setor de Ciências Agrárias
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA SCA

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo no. 030/2010, referente ao projeto “Suplementação de Luteína em dietas para cães da raça Beagle”, sob a responsabilidade de Lais Guimarães Alarça, na forma que foi apresentado, foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias, em reunião realizada dia 04 de março de 2011. Este certificado expira em 04 de março de 2012.


CERTIFICATE

We certify that the protocol number 030/2010, regarding the project “Lutein supplementation in the diet of Beagle dogs”, in charge of Lais Guimarães Alarça, in the terms it was presented, was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Southern Brazil) during session on March 2011. This certificate expires on March, 2012.

Curitiba, 04 de março de 2011.



Geraldo Camilo Alberton
Presidente



Patrick Schmidt
Vice-Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais
Setor de Ciências Agrárias
Universidade Federal do Paraná.

DEDICO

Aos meus amados pais.

Aos amigos cães, pois sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por serem os melhores que alguém poderia ter. Obrigada por todos os conselhos, por toda força e por estarem presentes em todos os meus passos. Obrigada por apoiarem minhas decisões, meus sonhos, me darem força para seguir minhas escolhas, por sempre me retribuírem com muito amor, paciência e dedicação. Todas as vitórias na minha vida, agora e sempre, eu devo a vocês.

À minha irmã, Lilian Alarça, por sempre estar presente e me mostrar todos os dias como um profissional deve ser. Obrigada por simplesmente existir e me ajudar em todas as fases da minha vida.

Ao Professor Sebastião Borges, por toda a ajuda, apoio e oportunidades durante esses dois anos e por aceitar ser meu orientador. Obrigada.

Ao Professor Alex Maiorka, por ser mais do que um coorientador. Por ser amigo, mestre, por sempre estar disponível para conversas e para dar conselhos. Obrigada por toda ajuda, pelas risadas e pela orientação durante esses dois anos. Agradeço também a Professora Simone Oliveira, pelo carinho e por toda a ajuda durante essa fase da minha vida.

À querida Professora Ananda Félix. Nunca conseguirei colocar em palavras o quanto sou grata a você, pois jamais irei agradecer o suficiente. Obrigada por ser tudo em uma pessoa só, por ser orientadora, amiga, companheira para tudo e por ser essa pessoa iluminada. Obrigada por ser sempre um exemplo pessoal e profissional e por estar sempre disposta a me ajudar. Agradeço por ter tido o privilégio de fazer parte da sua vida e das suas conquistas durante esses dois anos.

À Professora Ana Vitória Fischer da Silva, pela ajuda, observações e sugestões dadas na elaboração deste trabalho. Obrigada!

À Kemim do Brasil, pela oportunidade de conduzir este experimento e ao Dr. Everton Krabbe pela ajuda e acompanhamento em todas as fases desta pesquisa. Obrigada também pelas considerações feitas para a elaboração desta dissertação.

À Nancy Rivera e Everson Nunes, por serem peças fundamentais na realização desse trabalho, por toda a paciência e atenção.

Às amadas amigas Ananda, Aline Paim e Juliana Comin, pois sem elas esta etapa da minha vida não existiria. Obrigada por serem estas amigas maravilhosas,

mais que especiais e por me incentivarem a entrar no mestrado. Vocês são pra sempre!

Aos amigos e mestres de graduação da UNESP Ilha Solteira pelas amizades, ensinamentos e aprendizados. Em especial ao Ely Urzulin e família, pela atenção, carinho e ajuda em todos os momentos, por sempre me acolherem como se fosse da família. Saudades.

Aos colegas do Laboratório de Nutrição Animal por me ajudarem com seus conhecimentos para a realização deste trabalho. Obrigada!

Aos amigos do LENCAN, Tatinha, Dani, Marina, Tabyta, Bruna Umbria, Lidiane, Ismaína, Gus e Aline por toda a ajuda no canil antes, durante e após a realização deste experimento e por todas as outras atividades com os cães. Aos amigos do LEPNAN por toda a ajuda, parceria e amizade de todos os dias. Sentirei muitas saudades de todos vocês.

À minha querida amiga “japonesa” Keila Fujii. Obrigada pelo apoio e amizade, por ser minha confidente e com quem sempre pude contar. Obrigada por todos os momentos, todas as conversas, por toda a paciência e companheirismo.

Aos irmãos que a vida me proporcionou, Leticia Longo e Conrado Ragazini, por, mesmo que distantes, sempre se fazerem presentes, me ajudando, me dando força e me colocando pra cima todas as vezes que precisei. Amo muito vocês.

Um obrigado especial aos amigos Nandinha, Diego e Leandrinho, pela ajuda na revisão desta dissertação. Obrigada por todas as opiniões, ajudas e conselhos.

Aos amigos queridos Paulinha, Ed, Léo, Nanda, Carol, Keila, Lininhas, Jú Comin, Gus Equato, Carlitos, Leandrinho, Diego, Fer Lowndes, Fer Maia, Cleusa e todos os outros que tornaram esses dois anos uma das épocas mais felizes da minha vida. Obrigada por estarem presentes nos momentos bons e ruins e me ajudarem a me tornar uma pessoa melhor tanto pessoal quanto profissionalmente. Obrigada por todas as histórias, risadas, pelo apoio, por tudo. Obrigada!

À todos aqueles que, nesta e em todas as fases da minha vida, contribuíram de inúmeras formas diferentes para que eu alcançasse meus objetivos. Muito obrigada!!

*“Sempre fazendo planos para o futuro...
Sempre sendo surpreendida pelo presente...”*

Paulo Coelho

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E UNIDADES	14
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17

CAPÍTULO I – REVISÃO DE LITERATURA – UTILIZAÇÃO DA LUTEÍNA COMO ALIMENTO FUNCIONAL: PROPRIEDADES E BENEFÍCIOS	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. ALIMENTOS FUNCIONAIS	20
2.1. Luteína.....	21
2.1.1. Definição e características	21
2.1.2. Bioquímica da luteína	24
2.1.3. Digestão e absorção da luteína	25
2.1.4. Efeitos benéficos à saúde	26
2.1.5. Característica imunomoduladora.....	28
2.2. Nutrição e Imunidade	31
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	33
REFERÊNCIAS.....	35

CAPÍTULO II - PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E DIGESTIBILIDADE DA DIETA SUPLEMENTADA COM LUTEÍNA EM CÃES.....	41
RESUMO.....	42
ABSTRACT.....	42
1. INTRODUÇÃO	43
2. MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1. Animais e alojamentos	45
2.2. Digestibilidade	46
2.3. Análises hematológicas.....	48

2.4. Isolamento das células mononucleares.....	49
2.5. Índice de proliferação de linfócitos	50
2.6. Determinação das subtipagens T CD4+ e T CD8+	50
2.7. Análise estatística.....	51
3. RESULTADOS.....	51
3.1. Digestibilidade	51
3.2. Análises hematológicas.....	52
3.3. Índices de T CD4+ e T CD8+	54
4. DISCUSSÃO	54
4.1. Digestibilidade	54
4.2. Proliferação de linfócitos e contagem de T CD4+ e T CD8+	55
5. CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS.....	57
 CONSIDERAÇÕES FINAIS	 60

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Estrutura química da luteína.....	24
--	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1. Composição química das dietas experimentais 46

Tabela 2. Médias dos coeficientes de digestibilidade aparente (%), energia metabolizável (EM) (kcal/kg) e características das fezes de cães alimentados com dieta controle e com luteína 52

Tabela 3. Médias dos parâmetros do hemograma das coletas de sangue realizadas no início (1^a coleta) e final (2^a coleta) em cães alimentados com as dietas, suplementada ou não com luteína 53

Tabela 4. Média do índice de proliferação de linfócitos sanguíneos (IPL) e contagem das subtipagens T CD4+ e T CD8+ em cães da raça Beagle recebendo dieta controle e suplementada com luteína por 120 dias 54

LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E UNIDADES

ANVISA - Associação Nacional de Vigilância Sanitária

CD – “*cluster differation*”

CDA - coeficiente de digestibilidade aparente

DMRI - Doença macular relacionada à idade

dL - decilitros

EEHA - estrato etéreo em hidrólise ácida

ENN - extrativos não nitrogenados

EB - energia bruta

EM - Energia metabolizável

EPM - erro padrão da média

FB- Fibra bruta

GALT - tecido linfoide associado ao intestino

g - gramas

HDL- lipoproteínas de alta densidade

IDR - Ingestão diária recomendável

IPL – índice de proliferação de linfócitos

IgA - imunoglobulina A

kg - quilogramas

kcal - quilocalorias

LDL - lipoproteínas de baixa densidade

LT - Linfócitos T

LB - Linfócitos B

MSF - matéria seca fecal

MS - matéria seca

MO - matéria orgânica

mg - miligramas

m - metros

mm³ - milímetros cúbicos

mm - milímetros

mL - mililitros

mM - milimolar

μL - microlitros

NEM - Necessidade de energia metabolizável

NK - células "*natural killers*"

nm - nanômetros

PV - peso vivo

PB - proteína bruta

P - probabilidade

rpm - rotações por minuto

SI - sistema imune

SFB - soro fetal bovino

TGI - trato gastrintestinal

THF - tetrahydrofurano

Tc - Linfócitos T citotóxicos

Th - Linfócitos T *helper*

TGI - trato gastrintestinal

U - unidades

u^3 - unidade cúbica

VLDL - lipoproteínas de muita baixa densidade

USO DA LUTEÍNA EM DIETAS PARA CÃES

RESUMO

Carotenóides são pigmentos naturais que proporcionam efeitos benéficos específicos ao organismo, como melhora da resposta imune e saúde intestinal. Dentre estes, a luteína vem chamando atenção pelos seus efeitos imunomoduladores, atuando principalmente sobre os linfócitos T do sangue. Em cães, pesquisas comprovaram que estes animais podem absorver a luteína da dieta. Devido à alta relação entre a nutrição e a imunidade, foi conduzido um experimento objetivando avaliar a digestibilidade e a imunomodulação em cães alimentados com dieta suplementada com luteína. Dezesesseis cães adultos da raça Beagle foram distribuídos em dois grupos com oito animais cada, em delineamento inteiramente casualizado. Os cães foram alimentados por um período de 120 dias com dietas isonutritivas, diferindo apenas em relação à inclusão de 45 mg de luteína/kg de alimento para o grupo teste. Para avaliação imunológica, foram coletadas amostras de sangue no início e final do período experimental de todos os animais, para mensuração dos valores de proliferação de linfócitos totais e subtipagens CD4⁺ e CD8⁺, por meio de citometria de fluxo. Para avaliação da digestibilidade das dietas, o período experimental foi de 10 dias, sendo cinco dias de adaptação e cinco dias de colheita total de fezes. As fezes e as dietas foram avaliadas quanto à matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), proteína bruta (PB), extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA), extrativos não nitrogenados (ENN), energia bruta (EB) e metabolizável (EM). Não houve diferença quanto aos coeficientes de digestibilidade aparente entre o tratamento controle e o suplementado com luteína. A suplementação de luteína não alterou a quantidade de linfócitos totais e o índice de proliferação de linfócitos, porém resultou em maiores concentrações dos subtipos CD4⁺ e CD8⁺. A luteína não altera a digestibilidade da dieta e demonstrou ter efeito imunomodulador sobre específicos subtipos de linfócitos importantes para a resposta imune do animal.

Palavras-chave: alimentos funcionais, carotenóides, imunidade, imunomoduladores, nutrição.

USE OF LUTEIN IN DIETS FOR DOGS

ABSTRACT

Carotenoids are natural pigments that provide specific benefits to the body such as improved immune response and intestinal health. Among these, lutein has been drawing attention for its immunomodulatory effects, acting mainly on T lymphocytes of the blood. In dogs, studies have shown that these animals can absorb lutein from the diet. Due to the high relationship between nutrition and immunity, an experiment was conducted to evaluate the digestibility and immunomodulation in dogs fed with lutein supplemented diet. Sixteen adult beagle dogs were divided into two groups with eight animals each, in a randomized design. The dogs were fed for a period of 120 days with isonutritive diets, differing only in relation to the inclusion of 45 mg of lutein/kg of food for the test group. For immunological evaluation, samples of blood of all animals were collected at the beginning and end of the experiment to measure the values of the proliferation of lymphocytes and subtypes T CD4+ and T CD8+ cells, using flow cytometry. To evaluate the digestibility of the diets, twelve animals were placed in metabolic cages, in the experimental period of 10 days, five days of adaptations and five days of total feces collection. Feces and diets were evaluated for dry matter (DM), organic matter (OM), crude protein (CP), ether extract of acid hydrolysis (EEHA), nitrogen free extract (NFE), gross energy (GE) and metabolizable energy (ME). There was no difference in the apparent digestibility coefficients between treatments control and supplemented with lutein. The lutein supplementation did not alter the amount of lymphocytes and the rate of proliferation of lymphocytes, but resulted in higher concentrations of subtypes T CD4+ and T CD8+. Lutein did not alter the digestibility, and shows to have immunomodulatory effect on important specific lymphocyte subtypes of the immune response of the animals.

Keywords: functional foods, carotenoids, immunity, immune modulators, nutrition

CAPÍTULO I

REVISÃO DE LITERATURA – UTILIZAÇÃO DA LUTEÍNA COMO ALIMENTO FUNCIONAL: PROPRIEDADES E BENEFÍCIOS

1. INTRODUÇÃO

A nutrição dos animais de companhia vem acompanhando as tendências da nutrição humana, na qual o principal interesse é a busca por alimentos mais saudáveis e de melhor qualidade. Além de proporcionar um aporte nutricional correto, a nutrição pode garantir melhor qualidade de vida e maior longevidade a estes animais.

Pesquisas realizadas nesse campo vêm buscando maiores informações relacionadas ao papel dos diferentes ingredientes na manutenção, crescimento e desenvolvimento dos animais. Neste aspecto, os alimentos funcionais começaram a se destacar nos últimos anos, devido, principalmente, às suas características benéficas sobre a imunidade e ambiente intestinal dos animais (CARCIOFI, 2003).

A luteína, pigmento pertencente ao grupo funcional dos carotenóides, é um potente antioxidante com importantes características imunomoduladoras, atuando principalmente sobre os linfócitos T (CHEW, 1993). A produção desses linfócitos é realizada principalmente por células associadas à mucosa do intestino delgado, as quais representam a maior quantidade de células produtoras de linfócitos no organismo (VAN DER HEIDJEN, 1987).

Tendo-se conhecimento sobre a importância da relação entre a nutrição e a imunidade nos animais, presume-se que a luteína, ao fortalecer o sistema imunológico, atue sobre a saúde do trato gastrointestinal e favoreça a digestão e absorção dos nutrientes da dieta. Com base nestas afirmações, a presente dissertação objetivou relatar as características funcionais da luteína, discutindo seus principais efeitos benéficos ao organismo dos animais.

2. ALIMENTOS FUNCIONAIS

Dentre as inúmeras definições de alimentos funcionais, a mais aceita e difundida é de alimentos ou ingredientes que apresentam em sua composição substâncias bioativas, e quando consumidos na dieta usual, exercem não somente funções nutricionais básicas, mas propiciam outros benefícios fisiológicos específicos ao organismo. Esses benefícios podem variar de relevante para o bem-estar e qualidade de vida até a redução do risco de uma doença (CÂNDIDO & CAMPOS, 2005; MORAES & COLLA, 2006).

Outras terminologias como nutracêuticos, alimentos planejados, farmacêuticos ou fitoterápicos são relatados na literatura para se referir a estes ingredientes bioativos (ARAI, 1993; WRYCK, 1993; HUNT, 1994; BYRNE, 1994; REILLY, 1994; DE FELICE, 1995; ARAI, 1996; HASLER, 1998). Entretanto, o termo mais aceito e correto é “funcional”, já que estas outras terminologias podem sugerir erroneamente a idéia de medicamentos ou algo artificial.

O termo “funcional” surgiu por volta da década de 80 no Japão, motivado pela preocupação em garantir o bem estar e qualidade de vida da população, que apresentava uma expectativa de vida cada vez maior (MORAES & COLLA, 2006). Desde então, a comercialização destes cresceu mundialmente e atualmente são conhecidos mais de 600 alimentos funcionais, cada um com características benéficas diferentes.

Para ser caracterizado como tal, algumas propriedades e considerações devem ser levadas em conta. É necessário que as substâncias bioativas estejam presentes em sua composição em quantidades suficientes e adequadas para

produzir o efeito fisiológico desejado. Além disso, os efeitos positivos ao organismo devem ser obtidos em quantidades não tóxicas e obrigatoriamente devem durar mesmo após a suspensão de sua ingestão (ARABBI, 2001).

No Brasil, a lei que controla as especificações e garante a qualidade dos alimentos funcionais foi criada em 1999 pelo ministério da Saúde, ficando a cargo da ANVISA (Associação Nacional de Vigilância Sanitária) a responsabilidade pela inspeção. Para obter o registro de alimento funcional, a indústria precisa elaborar um relatório técnico detalhado, baseado em pesquisas científicas e obrigatoriamente deve especificar no rótulo a característica que garante o benefício fisiológico ao organismo e/ou redução no risco de certa doença (MORAES & COLLA, 2006).

Estudos focando os benefícios, doses indicadas e possíveis ações adversas com o uso por períodos prolongados destes alimentos, vêm surgindo para garantir e direcionar seu uso específico no auxílio à manutenção da saúde. Em cães, alguns alimentos funcionais têm sido utilizados com base em suas características, a fim de melhorar as dietas presentes no mercado. Dentre estes, estão os carotenóides, grupo no qual a luteína é uma das principais representantes.

2.1. Luteína

2.1.1. Definição e características

Carotenóides são pigmentos naturais encontrados em grande quantidade na natureza, produzidos por todos os organismos fotossintetizantes e alguns fungos e

bactérias. São divididos em dois grupos: carotenos, formados por hidrocarbonetos puros; e xantofilas, hidrocarbonetos que possuem grupos funcionais oxigenados, do qual a luteína é a principal representante (GOODWIN, 1965).

A luteína pode ser encontrada na indústria sob a forma de um pó amarelado, formado por cristais em forma de prisma com brilho metálico, cuja fórmula é $C_{40}H_{56}O_2$, peso molecular de 568.88 daltons e ponto de fusão a $190^{\circ}C$. É encontrada na maioria das frutas, vegetais de folhas escuras e em algumas flores, destacando-se a conhecida popularmente como “cravo-de-defunto” (KEMIN FOODS, 1999; LOURENÇO, 2005).

O cravo-de-defunto (*Tagetes erecta* L) é a principal fonte de obtenção da luteína utilizada industrialmente, principalmente por ser considerada uma fonte comprovadamente segura e apresentar elevada concentração deste carotenóide. NACHTIGALL (2007) encontrou diferenças na quantidade de luteína extraída dessa flor, variando de 454,5 mg até 2357 mg/100g, dependendo do processo de extração e solvente utilizado.

O extrato de tagetes, como é comercializado, contém aproximadamente 27% de carotenos, 1,5% de éster de criptoxantina e 86,1% de ésteres de xantofilas. Esta fração de xantofilas é formada quase que em sua totalidade pela luteína e zeaxantina (WANG et al., 2006). Por apresentarem fórmulas químicas moleculares idênticas e serem isômeros constitucionais, a luteína e a zeaxantina são mensuradas juntamente nos alimentos, devido à dificuldade em distingui-las para quantificação. Apresentam os mesmo benefícios ao organismo e diferem

entre si apenas pela posição de uma de suas duplas ligações (CANOVAS et al., 2009).

Os ésteres, uma das formas na qual a luteína pode ser encontrada nos alimentos, diferem quimicamente da forma pura cristalina, sendo miscíveis em óleos vegetais e produzindo cores nos alimentos que vão do amarelo-ouro ao laranja. Alguns autores sugerem a necessidade de uma dieta rica em ácidos graxos para que ocorra a mesma proporção de absorção da forma pura da luteína. Entretanto, tanto os ésteres quanto a forma pura apresentam os mesmos efeitos benéficos ao organismo (CANOVAS et al., 2009).

Atualmente existem muitas fórmulas farmacêuticas contendo luteína, geralmente associadas a vitaminas e outros antioxidantes. Na indústria de alimentos são comumente utilizados como corantes naturais, substituintes mais saudáveis dos corantes sintéticos (MATIOLI & RODRIGUEZ-AMAYA, 2003). Também são utilizados para melhorar o produto e estimular seu consumo, já que estes são precursores de compostos químicos responsáveis pelo aroma de alguns alimentos e fotoproteção (VALDUGA et al., 2009).

Na nutrição animal, o extrato de tagetes já é utilizado para objetivos específicos, como aumentar a cor amarela da gema dos ovos em galinhas de postura (WANG et al., 2006). Outras características como repor a cor perdida durante o processamento e armazenamento, colorir alimentos incolores e uniformizar a coloração de alguns produtos, vêm estimulando a utilização dos carotenóides na alimentação humana e animal (PSZCZOLA, 1998).

2.1.2. Bioquímica da luteína

A luteína, como a maioria dos carotenóides, apresenta estrutura linear com 40 carbonos, duas estruturas cíclicas e 11 duplas ligações conjugadas (Figura 1). É este extensivo conjunto de duplas ligações que garante as suas propriedades especiais (FRASER & BRAMLEY, 2004).

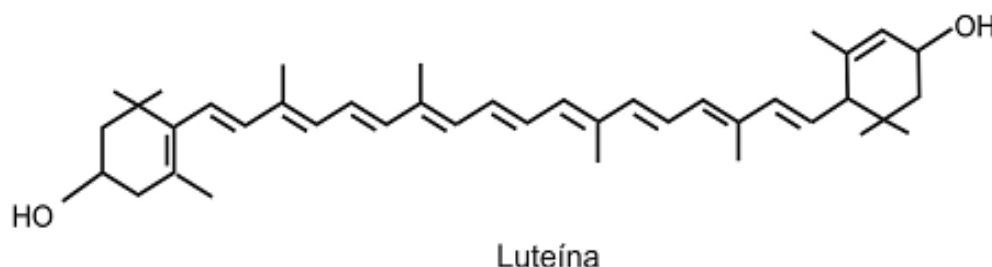


Figura 1. Estrutura química da luteína (Adaptado de BERMÚDEZ-PIRELA et al., 2005)

cozimento e presença de gordura na dieta também são fatores influentes, aumentando a biodisponibilidade da luteína e zeaxantina (DIMITROV et al., 1988).

Além disso, sabe-se que o tipo de carotenóide utilizado também é um fator de diferenciação, pois xantofilas apresentam maior biodisponibilidade quando comparadas aos carotenos. VAN HET HOF et al. (1999), comparando a biodisponibilidade da luteína com o β -caroteno em vegetais, constataram que a luteína é cinco vezes mais biodisponível.

2.1.3. Digestão e absorção da luteína

Os mamíferos domésticos não sintetizam carotenóides e alguns destes também não os absorvem em quantidades suficientes (KIM et al., 2000b). Sua presença no organismo, portanto, está relacionada ao consumo de uma dieta rica em alimentos fonte. A luteína, especificamente, está presente em todos os vegetais de folhas escuras e frutas coloridas, e é o carotenóide encontrado em maior quantidade no plasma humano e de certos animais, como ratos e algumas aves (STRINGHETA et al., 2006).

Após a digestão e liberação no lúmen do trato gastrintestinal (TGI), os ésteres de luteína sofrem hidrólise pela enzima hidrolase-éster-carboxílica, e são incorporados aos ácidos biliares, ácidos graxos livres, monoglicerídeos e fosfolipídeos, formando micelas denominadas quilomícrons (BOREL et al., 1996). Estas transportam a luteína absorvida via linfa pela circulação central até chegar ao fígado. Pequenas porções de quilomícrons também podem ser absorvidas diretamente por outros tecidos. No fígado, interagem com receptores presentes nos hepatócitos, que incorporam a maioria deste carotenóide em lipoproteínas de

alta (HDL), baixa (LDL) e muito baixa densidade (VLDL), cuja função é facilitar sua distribuição aos tecidos periféricos (PETERSON et al., 1983).

A partir daí, a quantidade de luteína encontrada nos tecidos é variável e dose-dependente (ERDMAN et al., 1993; ZARIPEH & ERDMAN JR., 2002). Em seres humanos, estudos constataram concentrações elevadas de xantofilas no fígado; relativamente elevadas na adrenal, tecido adiposo, rim, mama e pâncreas; e reduzidas no pulmão, pele, coração, testículo e ovários (MARES-PERLMAN et al., 2002).

Utilizando cães, CERVENY et al. (1998) demonstraram que estes absorvem carotenóides da dieta, porém ainda não foram estipuladas quantidades diárias recomendadas de ingestão para estes animais. De acordo com o NRC (2008), o nível de ingestão diária recomendável (IDR) é de 1,8 mg/kg de peso vivo (PV), com histórico comprovado de 0,45 mg/kg de PV. Não há relatos na literatura sobre casos de intoxicação por níveis excessivos de luteína dietética em cães.

2.1.4. Efeitos benéficos à saúde

A luteína, assim como todas as xantofilas, não apresenta a função característica do grupo dos carotenos de atividade pró-vitamina A, porém se destaca por outras funções importantes, como proteção dos olhos, pele e fortalecimento do sistema imune (MELÉNDEZ-MARTINEZ et al., 2004). Estudos indicam que sua ação benéfica está principalmente ligada a sua alta capacidade antioxidante, devido à alta eficiência em absorver e estabilizar radicais livres (OLSON, 1999). Tal fator é fundamental para garantir a proteção das células e tecidos contra os danos causados pelo estresse oxidativo (SILVA, 2003).

Outra característica benéfica já conhecida relacionada a esse carotenóide é a de pigmento protetor macular, responsável pela prevenção de doenças como a DMRI (doença macular relacionada à idade) e catarata (CANOVAS et al., 2009). Além destas, outros efeitos são listados na literatura como prevenção da aterosclerose, proteção da pele por danos causados por radiação ultravioleta, câncer e doenças coronárias (CHASAN-TABER et al., 1999; DAGNELIE et al., 2000; SUMANTRAN et al., 2000; ALVES-RODRIGUES & SHAO, 2004; DELI et al., 2004; KRINSKY & JONHSON, 2005; SANTOCONO et al., 2007).

Em relação ao efeito preventivo para cânceres, acredita-se que os possíveis mecanismos de proteção se devem, além do seu poder de sequestrar radicais livres, à ação moduladora no metabolismo do carcinoma, inibição da proliferação celular, aumento da diferenciação celular via retinóides, estimulação da comunicação entre células e aumento da resposta imune (GOMES, 2007). KEMIN FOODS (1999) observaram aumento da sensibilidade a agentes quimioterápicos das células tumorais no epitélio mamário de ratos, demonstrando assim o efeito seletivo da luteína sobre células cancerígenas.

Na redução de doenças cardiovasculares, indivíduos com concentrações séricas mais elevadas de carotenóides apresentariam menor risco para desenvolvimento de doença coronariana (MORENO & ONG, 2006). DWYER et al. (2001) observaram que a luteína é eficaz em reduzir a oxidação de LDL, uma das principais causas de doenças cardíacas, além de inibir respostas inflamatórias de monócitos causadas por estas nas paredes das artérias. ALVES-RODRIGUES & SHAO (2004) observaram redução das hidroperoxidações lipídicas e tamanho das

lesões aórticas em ratos recebendo dieta suplementada com carotenóides, provando assim a eficácia na prevenção contra enfartes.

2.1.5. Característica imunomoduladora

Na presença do antígeno, a resposta imune inicial é acionada utilizando como fonte de energia os radicais livres. A produção desses radicais é capaz de afetar o correto funcionamento do sistema imunológico, podendo destruir a parede das células de defesa e interferir na produção e função dos anticorpos (STOREY, 1996). Para reduzir ou evitar estes danos, é importante que a dieta contenha um potente antioxidante, como a luteína.

A resposta imunológica nos animais apresenta dois componentes principais: a inata (inespecífica) e adaptativa (específica). A inata é a primeira linha de defesa a ser ativada pelo organismo e nela estão incluídas as barreiras físicas e bioquímicas dos epitélios e mucosas, células fagocitárias, “natural killers” (NK) e constituintes protéicos sanguíneos (TIZARD, 2002).

O sistema imunológico adaptativo por sua vez, somente é ativado se a primeira linha de defesa for ultrapassada, e envolve a geração de uma resposta produzida por células linfocitárias. Esse sistema é responsável pelas respostas: antígeno-específica, mediada pelos linfócitos T (LT), importante por reconhecer e montar a resposta celular imunológica contra antígenos; e humoral, mediada por linfócitos B (LB), responsável pela produção de anticorpos (TIZARD, 2002). Em cães, estudos demonstram que os principais efeitos da inclusão de crescentes

níveis de luteína dietética estão principalmente relacionados ao aumento da resposta imune específica (KIM et al., 2000a).

Os LT correspondem a cerca de 70-80% dos linfócitos circulantes no sangue periférico (HILLMAN et al., 2005). Linfócitos que apresentam marcadores CD4+ e CD8+ são denominados auxiliares (Th) e citotóxicos (Tc) respectivamente, e exercem funções específicas importantes no sistema imunológico. Na presença de antígeno estranho, os Th são ativados e secretam glicoproteínas denominadas citocinas, fundamentais na ativação dos LB, Tc e macrófagos. Por sua vez, Tc ativados destroem antígenos endógenos, montando assim a resposta imunológica do organismo (TIZARD, 2002).

Cães e gatos domésticos são eficientes modelos em pesquisas focando a função imunomodulatória de certos carotenóides. O β -caroteno e a luteína, principalmente, incorporam-se aos linfócitos, principalmente aos LT, e neutrófilos, sendo eficazes na proteção das suas proteínas, membranas lipídicas e DNA contra os danos causados pelos radicais livres (CHEW & PARK, 2004).

Pesquisa recente utilizando gatos idosos demonstrou que a suplementação dietética de luteína resultou em maior título de anticorpos e maior proliferação de linfócitos mediante estimulação com concanavalina A (mitógeno indutor de produção de LT) (HARPER, 2001). Em cães, a luteína estimulou as respostas imunológicas celular e humoral aumentando a proliferação dos linfócitos, principalmente as porcentagens de LT CD5+, LT CD4+ e LT CD8+, após estimulação com fitohemaglutinina e concanavalina A (KIM et al., 2000a). Estes resultados demonstram que os efeitos benéficos da luteína no sistema imune se

devem tanto ao seu poder antioxidante quanto à característica efetiva em estimular a produção de linfócitos.

Em estudo utilizando cadelas da raça Beagle com 18 meses de idade, BYRNE et al. (2000) encontraram valores normais de 45,0% e 28,8% de LT CD4+ e LT CD8+ respectivamente, em relação aos linfócitos totais, mantendo-se uma relação CD4+:CD8+ de 1,87. Na literatura, a proporção encontrado como normal de células CD4+:CD8+ é de 2:1, mas este pode ser alterado em quadros de imunodeficiências, doenças autoimunes e outras como leucemias e linfomas (HILLMAN et al., 2005; KINDT & GOLDSBY, 2007).

KIM et al. (2000b) utilizando cães da raça Beagle com idade entre 17 a 18 meses, forneceram dietas suplementadas com 0, 5, 10 ou 20 mg/kg de luteína durante 12 semanas, e verificaram que, já na segunda semana a luteína era encontrada no plasma e sua concentração era dose-dependente. Os animais recebendo a dieta contendo 20 mg apresentaram elevado aumento na proliferação de linfócitos ao final do experimento. Em relação aos LT, os grupos suplementados apresentaram porcentagens de LT CD4+ e LT CD8+ maiores que o grupo controle, sendo encontradas maiores concentrações dos LT CD4+.

Utilizando filhotes de cães recebendo dieta suplementada com vitamina E, β -caroteno e luteína a partir da 6ª semana de vida, DESHMUKH (2008) encontrou níveis mais altos de LT e LB nas 14ª e 22ª semanas de vida, em comparação aos animais alimentados com a dieta padrão. Em contrapartida, KLEIN (2004), também avaliando filhotes recém-nascidos, com suplementação de 20% por um

período de 45 dias, não encontrou mudanças significativas nas subpopulações de LT neste período.

Em gatos com 10 meses de idade, recebendo suplementação de 0, 1, 5 e 10 mg de luteína por 12 semanas, houve aumento na porcentagem de LT CD4+ e LT CD21+ no nível mais alto de suplementação, sem apresentar, entretanto, efeito na população total de linfócitos e LT CD8+ (KIM et al., 2000b). Por outro lado, HARPER (2001) avaliando antioxidantes como a luteína, sugere que há aumento na proliferação de linfócitos e quantificação de anticorpos com a suplementação destes em gatos idosos.

Os diferentes resultados apresentados na literatura abrem espaço para a realização de novas pesquisas utilizando luteína. Estas focam no interesse em informações específicas, como quantidades específicas para cada animal, períodos de suplementação e possíveis efeitos ainda não estudados da luteína.

2.2. Nutrição e Imunidade

O potencial de modular a resposta imune do organismo por meio do uso de nutrientes específicos é denominado imunonutrição. Alguns destes nutrientes já apresentam papel imunomodulador bem definido, sendo as células imunes presentes no tecido inerente ao intestino os alvos mais comuns dessa regulação (CALDER, 2008).

O intestino é importante não somente pela sua função na digestão e absorção dos nutrientes. O interesse por seu papel imunológico vem crescendo, devido ao fato de que este é o órgão que apresenta a maior quantidade de células

imunes no organismo (SWANSON & FAHEY, 2007). Neste, a função imune é composta por três componentes: a barreira física; o sistema imune - composto pelo tecido linfóide associado ao intestino (GALT), plasmócitos, linfócitos e imunoglobulinas; e a microbiota intestinal (GUARNER, 2006).

O GALT é a coleção mais larga de tecidos linfóides, consistindo de tecido linfóide organizado, como linfonodos mesentéricos e placas de *Peyer*, e difuso, com linfócitos dispersos pela lâmina própria do trato gastrointestinal e a lâmina própria, com a presença de plasmócitos produtores de IgA (FORCHIELLI & WALKER, 2005). Cerca de 25% da mucosa e submucosa intestinal são compostas por tecido linfóide (SWANSON & FAHEY, 2007), o que possibilita que a resposta imune inicie no intestino e a partir daí, seja montada para o resto do organismo.

Outro fator importante relacionado ao intestino é que este é responsável por 17 a 25% do consumo de oxigênio de todo o corpo, caracterizando-o como um órgão metabólico extremamente ativo (FERRARIS & CAREY, 2000). Devido a esse alto consumo de oxigênio, presume-se que a utilização de antioxidantes eficientes na dieta aumenta a proteção, principalmente de suas células absorptivas, garantindo sua função celular adequada e eficiente. O fortalecimento destas células pode aumentar a capacidade de absorção e digestão dos nutrientes, influenciando assim, a digestibilidade da dieta.

Na literatura, não foram encontrados dados que demonstrem essa possível melhora de digestibilidade com a inclusão de imunomoduladores, como a luteína,

necessitando, portanto, de maiores pesquisas relacionando estes alimentos a seu papel na relação nutrição:imunidade.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Reconhecendo o papel benéfico importante que o sistema imune apresenta no TGI, é importante investigar a nutrição como fator decisivo no papel que a imunidade irá exercer na saúde do organismo. Neste aspecto, os alimentos funcionais vêm ganhando cada vez mais importância devido às suas diferentes características benéficas.

Devido à relação estabelecida entre nutrição e saúde animal, acredita-se que ao utilizar luteína nas formulações das dietas, haverá benefícios ao sistema imune e conseqüentemente à saúde do TGI por completo. Portanto, o potencial para uso com o intuito de aumentar a digestibilidade da dieta é promissor, embora ainda não estudado.

Em relação ao seu papel no fortalecimento do sistema imune, as evidências do efeito imunomodulador deste carotenóide já são conhecidas, porém existem resultados diferentes com base na quantidade e no tempo de suplementação dietética nas diferentes espécies animais. É necessário estabelecer com base em pesquisas detalhadas, a quantidade ideal e eficaz desse carotenóide adicionada à dieta de cães.

Com base nas características benéficas relacionadas a luteína, o uso deste carotenóide em formulações específicas se mostra promissor. Devido

principalmente a seus efeitos benéficos aos olhos, sistema imune e prevenção de doenças como câncer, a utilização em formulações destinadas às raças de cães e gatos, principalmente, propensas à sofrer destes problemas é uma das muitas possibilidades de utilização da luteína na dieta dos animais de companhia. Além destes fatores, outras possibilidades como utilizações específicas para animais filhotes, que necessitam de um forte sistema imune para responder às diversas vacinações se tornam interessantes. Ainda, em dietas para animais idosos, para fortalecer a resposta imune e torná-los menos propensos à enfermidades e assim aumentar a sua longevidade, é um dos fatores que pode estimular a inclusão deste carotenóide nas formulações comerciais para animais de companhia.

REFERÊNCIAS

ALVES-RODRIGUES, A.; SHAO, A. The science behind lutein. **Toxicology Letters**, v. 150, p. 57-83, 2004.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 05 mai. 2011.

ARABBI, R.P. Alimentos Funcionais: aspectos gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, São Paulo - SP, v.21, p. 87-102, jun., 2001.

ARAI, S. Physiological functions of foods. **Proceedings of the 6th International Congress on Engineering and Food**, Chiba, Japan, p.48-53, 1993.

ARAI, S. Studies on functional foods in Japan - state of the art. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v.60, p. 09-15, 1996.

BERMUDEZ-PIRELA, V.; BERMUDEZ-ARIAS, F.; LEAL-GONZALEZ, E.; MENGUAL-MORENO, E.; LEMUS-ANTEPAZ, M.; ACOSTA, A.G.; ANDARA, C.V.; ANGULO, V.C.; ARRAIZ, N.; RAMÍREZ, I. Quimioprevención del cáncer de mama: fronteras y horizontes. **Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica**, v.24, n.1, p.32-41, 2005.

BOREL, P.; GROLIER, P.; ARMAND, M.; PARTIER, A.; LAFONT, H.; LAIRON, D.; AZAIS-BRAESCO, V. Carotenoids in biological emulsions: solubility, surface-to-core distribution, and release from lipid droplets. **Journal of Lipid Research**, v.37, p.250-261, 1996.

BYRNE, M. Nutraceuticals: food fad or future trend? **Food Engineering International**, v. 19, p.42-43, 1994.

BYRNE, K.M.; KIM, H.W.; CHEW, B.P.; REINHART, G.A.; HAYEK, M.G. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v.73, n.2, p.167-182, 2000.

CALDER, P. Nutrition and inflammatory. In: **Proceedings of the Nutrition Society**, v.67. Disponível em: <http://www.bmj.com/content/327/7407/117>. 2008.

CANDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. Alimentos funcionais- Revisão. **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 29, n. 2, p. 193-203, 2005.

CANOVAS, R.; CYPEL, M.; FARAH, M. E.; BELFORT JR., R. Pigmentos maculares. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 72, p.839-844, 2009.

CARCIOFI, A. C. Nutrição ótima para cães e gatos. **Clínica Veterinária**, v.47, p.72-78, 2003.

CERVENY, C.; CHEW, B.P.; CHA, N.; WONG, T.S.; PARK, J.S.; WENG, B.C.; HAYEK, M.G.; REINHART, G.A. Lutein uptake by blood and leukocytes in the dog. **FASEB Journal**, v.12, p. 857, 1998.

CHASAN-TABER, L.; WILLETT, W.C.; SEDDON, J.M.; STAMPFER, M.J.; ROSNER, B.; COLDITZ, G.A.; SPEIZER, F.E.; HANKINSON, S.E. A prospective study of carotenoid intake and risk of cataract extraction in US women. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.70, p.509-516, 1999.

CHEW, B.P. Role of carotenoids in the immune response. **Journal of Dairy Science**, v.76, p. 2804-2811, 1993.

CHEW, B.P.; PARK, J.S. Carotenoid action on the immune response. **Journal of Nutrition**, v.134, p.257-261, 2004.

DAGNELIE, G.; ZORGE, I.; McDONALD, T.M. Lutein improves visual functions in some patients with retinal degeneration: a pilot study via the internet. **Optometry**, v.71, p.147-164, 2000.

DE FELICE, S.L. The nutraceutical revolution: its impact on food industry R & D. **Trends in Food Science and Technology**, v.6(2), p.59-61, 1995.

DELI, J.; MOLNÁR, P.; OSZ, E.; TÓTH, G.; ZSILA, F. Epimerisation of lutein to 3'-epilutein in processed foods. **Bioorganic & Medicine Chemistry Letters**, v.14, p.925-928, 2004.

DESHMUKH, A. O Sistema imunológico e seu papel como um sistema protector para cães. In: **Sistemas de Protecção Natural em Caninos Proplan Purina®**, p.1-15, 2008.

DIMITROV, N.V.; MEYER, C.; WEREY, D.E.; CHENOWETH, W.; MICHELAKIS, A.; MALONE, W.; BOONE, C.; Fink, P.G. Bioavailability of betacarotene in humans. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.48(2), p.298-304, 1988.

DWYER, J.H.; NAVAB, M.; DWYER, K.M.; HASSAN, K.; SUN, P.; SHIRCORE, A.; HAMA-LEVY, S.; HOUGH, G.; WANG, X.; DRAKE, T.; MERZ, C.N.; FOGELMAN, A.M. Oxygenated carotenoid lutein and progression of early atherosclerosis: the Los Angeles atherosclerosis study. **Circulation**, v.103, p.2922-2927, 2001.

ERDMAN Jr, J.W.; BIERER, T.L.; GUGGER, E.T. Absorption and transport of carotenoids. Review. **Annual NY Academy Science**, v.691, p.76-85, 1993.

FERRARIS, R.; CAREY, H. Intestinal transport during fasting and malnutrition. **Annual Revist of Nutrition**, v.20, p.195-219, 2000.

FORCHIELLI, M.L.; WALKER, W.A. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. **British Journal of Nutrition**, v.93(1), p.S41-S48, 2005.

FURR, H. C.; CLARK, R. M. Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, v.8, p.364–377, 1997.

FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v.43, p.228-265, 2004.

GOMES, F.S. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.20(5), p.537-548, set./out., 2007.

GOODWIN, T.W. Chemistry and biochemistry of plant pigments. **Academic Press**. 1965.

GUARNER, F. Enteric flora in health and disease. **Digestion**, v.73, n.1, p.5-12, 2006.

HARPER, J. Feline immunocompetence, ageing and role of antioxidants. In: WSAVA CONGRESS, 2001, Vancouver. **Abstracts...Vancouver**, p.63, 2001.

HASLER, C. A new look at an ancient concept. **Chemistry & Industry**, 2 February, p.84-89, 1998.

HILLMAN, R.; AULT, K.; RINDER, H. Hematology in clinical practice. **McGraw-Hill**, p. 253-292, 2005.

HUNT, J.R. Nutritional products for specific health benefits-foods, pharmaceuticals, or something in between? **Journal of the American Dietetic Association**, v.94(2), p.151-153, 1994.

KEMIN FOODS L. C. BIOLOTUS. **Diferenças químicas entre FloraGLO luteína e extrato de flores Tagetes erecta**. Rio de Janeiro, 1999. (Literatura Técnica)

KIM, H.W.; CHEW, B.P.; WONG, T.S.; PARK, J.S.; WENG, B.B.C.; BYERNE, K.M.; HAYEK, M.G.; REINHART, G.A. Dietary lutein stimulates immune response in the canine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.74, p.315–327, 2000a.

KIM, H.W.; CHEW, B.P.; WONG, T.S.; PARK, J.S.; WENG, B.B.C.; BYERNE, K.M.; HAYEK, M.G.; REINHART, G.A. Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by dietary lutein in cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.73, p.331–341, 2000b.

KINDT, T.; GOLDSBY R. Kuby immunology. 6ª edição. **W. H. Freeman and Company**. p. 23-49, 2007.

KLEIN, S.L. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. **Parasite Immunology**, v. 26(6-7), p.247-264, 2004.

KRINSKY, N.I.; JONHSON, E.J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v.26, p.459-516, 2005.

LOURENÇO, M.L.G. **Efeito da idade e da suplementação com luteína no hemograma, nas enzimas hepáticas, na glicemia e no proteinograma de neonatos felinos.** Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu-SP, 2005.

MARES-PEARLMAN, J.A.; MILLEN, A.E.; FICEK, T.L.; HANKINSON, S.E. The body of evidence to support a protective role for lutein na zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview. **Journal of Nutrition**, v.132 (3), p.518S-524S, 2002.

MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, dez., 2003.

MELÉNDEZ-MARTINEZ, A.J.; VICARIO, I.M.; HEREDIA, F.J. Importância nutricional de los pigmentos carotenoides. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.54, p.149-155, jun., 2004.

MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutraceuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 03, p.109-122, 2006.

MORENO, F.S.; ONG, T.P. Luteína e zeaxantina: componentes funcionais de alimentos. **ILSI Brasil Notícias**, ano 14, núm. 02, abr-jun, 2006.

NACHTIGALL, A. M.; STRINGHETA, P. C; FIDELIS, P. C.; NACHTIGALL, F. M. Determinação do teor de luteína em hortaliças. **Boletim CEPPA**, v. 25, n. 2, 2007.

NRC - **National Research Council. Safety of Dietary Supplements for Horses, Dogs, and Cats.** 216p. 2008.

OLSON, J.A. Carotenoids and human health. **Archives of Latinoamerican Nutrition**, v.49(1-S):p.7-11, 1999.

PARKER, R.S. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. **FASEB Journal**, vol.10, núm.5, 542-551, 1996.

PETERSON, M. E.; KINTZER, P. P.; CAVANAGH, P. G.; FOX, P. R.; FERGUSON, D. C.; JOHNSON, G. F.; BECKER, D. V. Feline hyperthyroidism: pretreatment clinical and laboratory evaluation of 131 cases. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 183, n. 1, p. 103-110, 1983.

PSZCZOLA, D. E. Natural colors: pigments of imagination. **Food Technology**, vol.52, núm.6, p.70-82, 1998.

REILLY, C. Functional foods - a challenge for consumers. **Trends in Food Science and Technology**, v.5(4), p.121-123, 1994.

SANTOCONO, M.; ZURRIA, M.; BERRETTINI, M.; FEDELI, D.; FALCIONI, G. Lutein, zeaxanthin and astaxanthin protect against DNA damage in SK-N-SH

human neuroblastoma cells induced by reactive nitrogen species. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 88, n. 1, p. 1-10, 2007.

SILVA, P.C.F. da. **Propriedades antioxidantes *in vitro* de uva branca e de uva tinta e de seus respectivos vinhos elaborados**. 2003. 138p. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

STOREY, K.B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29, n.12, p.1715-1733, 1996.

STRINGHETA, P.C.; NACHTIGALL, A.M.; OLIVEIRA, T.T.; RAMOS, A.M.; SANT'ANA, H.M.P.; GONÇALVES, M.P.J.C. Lutein: antioxidant properties and health benefits. **Alimentação e Nutrição Araraquara**, v.17, n.2, p.229-238, abr./jun. 2006.

SUMANTRAN, V. N.; ZHANG, R.; LEE, D.S.; WICHA, M.S. Differential regulation of apoptosis normal versus transformed mammary epithelium by lutein and retinoic acid. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v.9, p.257-263, 2000.

SWANSON, K.S.; FAHEY, G.C. Jr. **Prebiotics in companion animal nutrition**. Theriogenology, 2007. Disponível em: http://www.engormix.com/e_articles_view.asp?art=414 Acesso em: 03/10/2010.

TIZARD, I.R. Veterinary Immunology: An introduction. (6th ed.). **Philadelphia: WB Saunders**, 2002.

VALDUGA, E.; TATSCH, P.O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenóides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v. 32, n. 9, 2009.

VAN DER HEIDJEN, P.J.; STOK, W.; BIANCHI, A.T. Contribution of immunoglobulin-secreting cells in the murine small intestine to the total “background” immunoglobulin production. **Immunology**, v. 62, p. 551, 1987.

VAN HET HOF, K.H.; BROWER, I.A.; WEST, C.E.; HADDEMAN, E.; SKEGERS-THEUNISSEN, R.P.; VAN DUSSELDOP, M.; WESTSTRATE, J.A.; ESKES, T.K.; GAJ, H.. Bioavailability of lutein from vegetables is 5 times higher than that of β -carotene. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.70(2), p. 261-268, 1999.

YEUM, K.J.; RUSSELL, R.M. Carotenoid bioavailability and bioconversion. **Annual Review of Nutrition**; v.22,p.483-504, 2002.

WANG, M.; TSAO, R.; ZHANG, S.; DONG, Z.; YANG, R.; GONG, J.; PEI, Y. Antioxidant activity, mutagenicity/anti-mutagenicity and clastogenicity/anti-clastogenicity of lutein from marigold flowers. **Food Chemistry Toxicology**, v.44, p.1522-1559, 2006.

WRICK, K.L. Functional foods: cereal products at the food-drug interface. **Cereal Foods World**, v.38(4): p.205-214, 1993.

ZARIPHEH, S.; ERDMAN JR., J.W. Factors that influence the bioavailability of xanthophylls. **Journal of Nutrition**, v.132(3), p.531S-534S, 2002.

CAPÍTULO II

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E DIGESTIBILIDADE DA DIETA SUPLEMENTADA COM LUTEÍNA EM CÃES

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E DIGESTIBILIDADE DA DIETA SUPLEMENTADA COM LUTEÍNA EM CÃES

(Hematological parameters and digestibility of diet with lutein supplementation in dogs)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a digestibilidade e os efeitos imunomoduladores da suplementação de luteína em dieta de cães da raça Beagle. Dezesesseis cães adultos foram distribuídos em dois grupos de oito animais cada, em delineamento inteiramente casualizado. Os cães foram alimentados por um período de 120 dias com dietas isonutritivas, diferindo apenas em relação à inclusão de 45 mg de luteína/kg de ração para a dieta do grupo teste. Amostras de sangue foram coletadas no início e ao final do período experimental, para avaliação dos valores de produção de linfócitos totais e linfócitos T CD4+ e T CD8+, por meio de citometria de fluxo. Foi realizada coleta de fezes total em gaiolas metabólicas durante 10 dias, sendo cinco dias para adaptação e cinco de coleta, para avaliação da digestibilidade aparente das dietas. Não houve diferença quanto aos coeficientes de digestibilidade aparente entre o tratamento controle e o suplementado com luteína. A suplementação de luteína não alterou a quantidade de linfócitos totais e o índice de proliferação de linfócitos, porém resultou em maiores concentrações dos subtipos T CD4+ e T CD8+. A luteína não altera a digestibilidade da dieta e características das fezes, porém fortalece o sistema imune, ajudando na melhora da saúde em geral desses animais.

Palavras-chave: carotenóides, citometria de fluxo, imunidade, imunomodulação.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the digestibility and the immunomodulatory effects of diet supplemented with lutein in dogs. Sixteen adult dogs were divided in two groups of eight animals each, in a randomized design and fed for a period of 120 days with isonutrient diets, differing only in respect of the inclusion of 45 mg of lutein/ kg of the diet for the test group. Blood samples were collected at the beginning and end of the trial period to evaluate the values of total lymphocytes and subtyping CD4+ and CD8+ by flow cytometry. Total feces

collection were realized in metabolic cages for 10 days (five days for adaptation and five of collection) to evaluate the digestibility of diets. There was no difference in the apparent digestibility coefficients between treatment control and supplemented with lutein. Lutein supplementation did not alter the amount of total lymphocytes and the proliferation index of lymphocytes, but resulted in higher concentrations of subtypes CD4+ and CD8+. Lutein did not alter the digestibility of the diet or characteristics of feces, but improve the immune system, improving the health in general of the animals.

Key-words: carotenoids, flow cytometry, immunity, immunomodulation.

1. INTRODUÇÃO

O uso de ingredientes com propriedades funcionais pode trazer benefícios importantes à saúde, como melhora na imunidade e no ambiente intestinal dos animais (CARCIOFI, 2003). Dentre estes ingredientes encontram-se os carotenóides, pigmentos naturais que apresentam propriedades benéficas à saúde, tanto em humanos quanto em animais, tais como o fortalecimento do sistema imunológico e a diminuição do risco de doenças degenerativas (ALVES-RODRIGUES & SHAO, 2004). De modo geral, estes pigmentos são classificados como carotenos e oxicarotenóides, também denominados de xantofilas, sendo a luteína e zeaxantina (compostos não pró-vitamina A) os principais carotenóides deste grupo (VALDUGA et al., 2009).

A luteína é encontrada na forma de um pó amarelado, obtido principalmente a partir do extrato de *Tagetes erecta*. Sua fórmula molecular é $C_{40}H_{56}O_2$, com ponto de fusão de 190°C e apresenta a característica de cristalizar-se na presença

de éter e metanol (LOURENÇO, 2005). Pode ser encontrada no mercado na forma não esterificada (purificada) em ampla gama de complexos vitamínicos e na forma esterificada juntamente com ácidos graxos na maioria das frutas, vegetais e flores (KEMIN FOODS, 1999).

A maioria dos estudos sobre a ação dos carotenóides tem como foco principal o β -caroteno, entretanto o interesse em pesquisas focando outros carotenóides como a luteína, tem aumentado consideravelmente (LOURENÇO, 2005). Dentre os principais benefícios relacionados à luteína, destacam-se o poder antioxidante e suas características imunomoduladoras, atuando principalmente sobre os linfócitos T do sangue.

Os linfócitos T correspondem cerca de 70-80% dos linfócitos circulantes no sangue periférico, sendo os principais responsáveis pelo auxílio ao sistema imunológico e resposta imunológica celular (KINDT & GOLDSBY, 2007). Dentre os principais subtipos estão os linfócitos T CD4+, chamados de auxiliares, e os T CD8+, chamados de citotóxicos. Os linfócitos T CD4+ apresentam função reguladora sobre o crescimento e proliferação de linfócitos B, T CD8+ e também autorregulação. Já os linfócitos T CD8+ são células efetoras com a capacidade de eliminar microrganismos intracelulares a partir da destruição da célula hospedeira (MOTTA Jr, 2005). Em amostras normais de sangue de cães, os valores de referência respeitam uma razão de 2:1 de linfócitos T CD4+ em relação a T CD8+ (EDWARS et al., 1995).

Estudos mostram que os cães podem absorver a luteína da dieta, sendo esta absorvida quase em absoluto pelos linfócitos presentes no sangue, podendo

aumentar não somente a eficiência do sistema imunológico como a saúde em geral desses animais (STRINGHETA et al., 2006). Este carotenóide demonstrou estimular as respostas imunológicas celular nestes animais por meio do aumento da resposta proliferativa dos linfócitos e nas porcentagens de T CD5+, T CD4+ e T CD8+ após a estimulação antigênica (KIM et al., 2000a).

Alguns dos nutrientes presentes na dieta, como a luteína, já apresentam papel imunomodulador bem definido, sendo as células imunes presentes no tecido inerente ao intestino os alvos mais beneficiados nessa regulação (CALDER, 2008). Portanto, presume-se que com utilização da luteína, ao fortalecer a função, vá exercer efeito também sobre o trato gastrointestinal. Espera-se, então, que a suplementação deste carotenóide possa tornar a digestão e absorção dos nutrientes mais eficientes e assim, aumentar a digestibilidade da dieta.

Em virtude da importância da luteína sobre a resposta imune e que esta apresenta grande relação com a nutrição e a saúde do trato gastrointestinal, avaliou-se os parâmetros hematológicos, digestibilidade e características faz fezes de cães alimentados com dieta suplementada com luteína.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais e alojamento

O experimento foi realizado no Laboratório de Estudos de Nutrição Canina, localizado no Campus de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba-PR. Para a avaliação dos parâmetros hematológicos, dezesseis

cães adultos e saudáveis da raça Beagle, com 2 anos de idade e $9,2 \pm 1,2$ kg (média \pm erro padrão) de peso corporal, foram divididos em delineamento inteiramente casualizado em dois grupos de oito animais (quatro machos e quatro fêmeas) cada, um recebendo a dieta controle e o outro a dieta teste, suplementada com luteína. Já para o ensaio de digestibilidade, 12 cães foram divididos em dois grupos de seis animais (três fêmeas e três machos) cada, um grupo controle e o outro teste.

Durante o ensaio imunológico, os cães foram mantidos em baias individuais de alvenaria com solário, medindo 5 m de comprimento x 2 m de altura. Para o ensaio de digestibilidade, os animais foram transferidos para gaiolas de aço inoxidável medindo 0,7 m de comprimento x 0,6 m de altura x 0,5 m de largura. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética ao Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná.

2.2. Digestibilidade

Cada grupo recebeu uma das dietas experimentais secas extrusadas (Tabela 1), uma controle e outra suplementada com 45 mg/kg de xantofilas ativas (fonte de luteína), extraída de Marigold, totalizando oito repetições por tratamento.

Tabela 1. Composição química das dietas experimentais.

Composição Química	Controle	Luteína
Matéria Seca (%)	93,3	92,1
Proteína Bruta (%)	22,0	21,3
Extrato Etéreo em hidrólise ácida (%)	10,4	10,2
Fibra Bruta (%)	2,8	2,7
Matéria Mineral (%)	9,6	9,7
Extrativos não-nitrogenados (%)	48,4	48,3
Energia Bruta (kcal/kg)	4.376	4.273

A alimentação foi oferecida duas vezes ao dia em quantidade suficiente para suprir as necessidades de energia metabolizável (NEM) de cães em manutenção, estimada por: $NEM \text{ (kcal/dia)} = 130 \times \text{peso corporal}^{0,75}$, preconizada pelo NRC (2006). A água foi fornecida *ad libitum*.

O período experimental para o ensaio de digestibilidade foi constituído de cinco dias de adaptação seguido por cinco dias de coleta total de fezes (AAFCO, 2004). As fezes foram coletadas duas vezes ao dia e armazenadas em freezer à temperatura de -14°C. Foi utilizado um fator de correção para estimativa da perda energética pela urina, conforme a AAFCO (2004). Posteriormente, as amostras compostas de fezes foram descongeladas, homogeneizadas e secas a 55°C em estufa de ventilação forçada (320-SE, Fanem, SP, Brasil) até atingir peso constante.

Realizou-se a moagem em moinho Wiley (Arthur H. Thomas Co., Philadelphia, PA, USA) a um tamanho de 1 mm e análise quanto os teores de matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra bruta (FB), matéria mineral (MM) e extrato etéreo em hidrólise ácida (EEHA), de acordo com a AOAC (1995). Os extrativos não-nitrogenados (ENN) foram estimados segundo a equação $ENN \text{ (g/kg)} = 100 - (\text{Umidade} + \text{PB} + \text{MM} + \text{EEHA} + \text{FB})$. As energias brutas (EB) das fezes e das dietas foram determinadas utilizando bomba calorimétrica (Parr Instrument Co., modelo 1261, Moline, IL, USA). Todas as análises foram realizadas em duplicata, com variação abaixo de 5%.

2.3. Análises hematológicas

Foram realizadas duas coletas de 10 mL de sangue, no início (dia 0) e no final do experimento (dia 120), nos cães em jejum e sempre no mesmo horário, por meio de venopunção jugular externa com seringa de 10 mL e agulha 25x7.

As análises de hemograma completo foram processadas após a coleta, sendo avaliados os seguintes parâmetros: número de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, contagem diferencial e total de leucócitos, volume corpuscular médio, concentração de hemoglobina corpuscular média e concentração de proteína plasmática.

Para determinação do hemograma foram utilizadas as técnicas de rotina descritas por JAIN (1993). As contagens totais de eritrócitos, leucócitos e a determinação da concentração de hemoglobina foram realizadas com auxílio do contador automático de células. O hematócrito foi determinado pelo método do microhematócrito e as concentrações de proteínas plasmáticas pelo método do refratômetro. O volume corpuscular médio e a concentração de hemoglobina corpuscular média foram calculados seguindo as fórmulas descritas por WINTROBE (1974).

Para a contagem diferencial de leucócitos foram confeccionadas duas lâminas por animal no momento da coleta. Os esfregaços sanguíneos foram corados com corante de Wright e posteriormente foi realizada a leitura de em média 200 células. Ao final do período experimental, amostras de sangue adicionais foram coletadas para realização da análise de índice de proliferação de linfócitos e contagem de linfócitos T CD4+ e T CD8+.

2.4. Isolamento das células mononucleares

Utilizou-se para a obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC), uma alíquota de 10 mL do sangue coletado e armazenado em tubos contendo heparina sódica, adicionada em tubos de polipropileno de 50 mL contendo 10 mL de Histopaque-1119. Realizou-se a centrifugação dos tubos por 40 minutos a 1410 rpm (Eppendorf- Centrifuge 5810 R) e em seguida, retirou-se a nuvem de células mononucleares separadas entre o Histopaque-1119 e o plasma, transferindo-a para novos tubos de polipropileno. Completou-se o volume para 20 mL com meio de cultura RPMI 1640 e 2% de soro fetal bovino (SFB) e novamente foi realizada a centrifugação, por cerca de 6 minutos a 1200 rpm. Desprezou-se o sobrenadante e repetiu-se o mesmo procedimento por mais duas vezes, para eliminação das plaquetas.

O “pellet” formado foi ressuspendido em 2 mL de meio de cultivo, RPMI 1640, 10% de SFB, antibióticos (100 U/mL penicilina e 100 mg/mL estreptomicina) e glutamina 2mM. A alíquota das células foi deixada em estufa de CO₂ a 37°C por no mínimo 2 horas, em tubos de cultura, para estabilização das mesmas para garantir a viabilidade celular. A viabilidade foi determinada após diluição de 1:2 das células no corante vital Azul de Tripan (MCB Manufacturing Chemist Inc., Cincinnati, OH, EUA) e posteriormente, seguiu-se a contagem em câmara de Neubauer. A leitura foi realizada com auxílio do microscópio óptico em aumento de 400x.

2.5. Índice de proliferação de linfócitos

Uma vez isoladas as células, 10^6 células/mL foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e 0,1% de antibióticos (penicilina 10.000U/mL e estreptomicina 10 mg/L), em placas de 96 poços (volume final de 200 μ L), a 37°C em atmosfera de 95% ar / 05% CO₂, por 48 horas. Os linfócitos foram estimulados com 20 μ L/escavação de solução com o mitógeno concanavalina A (Con A), estimulador da proliferação de linfócitos T. Após 72 horas, foi adicionado o reagente Vision Blue, 10 μ L por poço, e se deixou incubar por 2 horas. A fluorescência de cada amostra foi lida em espectrofluorímetro. A excitação no fluoróforo foi realizada a 530 nm e a emissão captada a 590 nm. O índice de proliferação dos linfócitos T foi obtido dividindo-se os valores dos poços com estímulo (Con A) pelos valores dos poços sem estímulo (meio RPMI).

2.6. Determinação das subtipagens T CD4+ e T CD8+

A contagem de linfócitos T CD4+ e T CD8+ foi realizada pelo método de citometria de fluxo. Anticorpos monoclonais de ratos foram utilizados para quantificar as subpopulações celulares nos cães: anti-CD4 (DH29A) e anti-CD8 (CADO46A). Para a análise de imunofluorescência, um total de 5×10^5 células foram armazenadas em placas de culturas mantidas no gelo. As células foram então centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C, descartando-se o sobrenadante. Em seguida, foi adicionado 10 μ L da solução de anticorpos sobre

cada amostra (não apenas nos controles negativos). As células foram então incubadas por 30 minutos no escuro a 4°C. Adicionou-se 400µL de tampão de ligação (2% soro fetal bovino, 10 mM Hepes, pH 7,4; 150 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 1,8 mM CaCl₂, esterilizado por filtração e armazenado a 4°C). Posteriormente as células foram lidas em citômetro de fluxo (FACS Calibur – BD biosciences). Os dados foram expressos como a percentagem de células positivas corrigida para células marcadas com o anticorpo controle isotópico para citometria de fluxo.

2.7. Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade para averiguar a distribuição normal e a seguir foi utilizado o teste *t* de Student, adotando o valor $P < 0,05$ como nível de significância.

3. RESULTADOS

3.1 Digestibilidade

Não foram observadas diferenças entre os CDA e EM entre os cães que receberam as dietas com ou sem a suplementação de luteína ($P > 0.05$) (Tabela 2). Todos os animais apresentaram adequado consumo alimentar para ambas as dietas.

O peso corporal, quantidade de fezes, matéria seca fecal e escore das fezes dos animais não diferiram em nenhum dos tratamentos durante o período experimental ($P>0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Médias dos coeficientes de digestibilidade aparente (%), energia metabolizável (EM) (kcal/kg) e características das fezes de cães alimentados com dieta controle e com luteína.

Variáveis	Controle	Luteína	EPM	P
MS (%)	71,1	71,7	2,02	0,410
MO (%)	77,9	78,7	1,44	0,412
PB (%)	78,8	78,9	1,58	0,494
EEHA (%)	82,7	84,1	2,12	0,480
ENN (%)	83,7	84,1	1,83	0,354
EB (%)	78,6	79,1	1,35	0,333
EM (kcal/kg)	3664,3	3648,4	62,88	0,343
Características das Fezes				
Fezes*	0,15	0,14	0,03	0,330
MSF (%)	39,9	41,8	0,83	0,654
Escore fecal	3,8	3,9	0,05	0,067

EPM: Erro Padrão da Média; P: probabilidade

MS: matéria seca; MO: matéria orgânica; PB: proteína bruta; EEHA: extrato etéreo em hidrólise ácida; ENN: extrativos não nitrogenados; EB: energia bruta.

MSF: Matéria seca fecal

*Produção de fezes na matéria natural (g) / matéria seca ingerida (g) / dia

3. 2. Análises hematológicas

Não foram encontradas diferenças estatísticas significativas entre os grupos controle e teste em nenhum dos parâmetros do hemograma ($P>0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3. Médias dos parâmetros do hemograma das coletas de sangue realizadas no início (1^a coleta) e final (2^a coleta) em cães alimentados com as dietas, suplementada ou não com luteína.

Parâmetro	Coleta	Controle	Luteína
Eritograma			
Hemácias ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	1 ^a	6,463 \pm 0,307	6,630 \pm 0,388
	2 ^a	6,340 \pm 0,858	6,491 \pm 0,357
Hemoglobina (g/dL)	1 ^a	14,440 \pm 0,678	14,740 \pm 0,848
	2 ^a	14,175 \pm 1,820	14,513 \pm 0,816
Hematócrito (%)	1 ^a	43,500 \pm 2,071	44,375 \pm 2,560
	2 ^a	42,630 \pm 5,731	43,635 \pm 2,386
VCM (μ^3)	1 ^a	67,313 \pm 0,034	66,970 \pm 1,066
	2 ^a	67,240 \pm 0,107	67,210 \pm 0,057
CHCM (g/dL)	1 ^a	33,191 \pm 0,194	33,241 \pm 0,365
	2 ^a	33,250 \pm 0,073	33,263 \pm 0,039
Proteína plasmática (g/dL)	1 ^a	7,050 \pm 0,583	6,630 \pm 0,087
	2 ^a	6,700 \pm 0,410	6,490 \pm 0,338
Leucograma			
Leucócitos (/mm ³)	1 ^a	11700 \pm 1470,6	9925 \pm 836,2
	2 ^a	10275 \pm 2040,1	8587 \pm 1591,4
Neutrófilos (%)	1 ^a	75,500 \pm 5,155	72,250 \pm 5,203
	2 ^a	70,375 \pm 5,125	68,375 \pm 4,033
Eosinófilos (%)	1 ^a	1,750 \pm 0,886	1,625 \pm 0,517
	2 ^a	2,625 \pm 1,061	2,375 \pm 1,187
Basófilos (%)	1 ^a	0	0
	2 ^a	0	0
Linfócitos (%)	1 ^a	17,125 \pm 3,979	20 \pm 3,625
	2 ^a	21,375 \pm 5,317	22,125 \pm 3,091
Monócitos (%)	1 ^a	5,625 \pm 1,923	6,375 \pm 1,598
	2 ^a	5,625 \pm 1,061	7,125 \pm 1,553

Os dados estão representados na forma de média \pm desvio padrão.

A luteína não interferiu nos parâmetros do hemograma completo. Os valores observados encontram-se dentro da faixa de referência considerada normal para a espécie estudada, atestando a higidez dos cães usados neste experimento.

3.3. Índices de $T CD4^+$ e $T CD8^+$

Não houve diferença entre o índice de proliferação de linfócitos nos animais recebendo a dieta controle e suplementada com luteína ($P>0,05$). Em relação à contagem dos subtipos de linfócitos $T CD4^+$ e $T CD8^+$, o grupo recebendo a dieta suplementada com luteína apresentou níveis mais altos em ambos os subtipos em relação ao grupo controle ($P>0,05$) (Tabela 4).

Tabela 4. Média do índice de proliferação de linfócitos sanguíneos (IPL) e contagem das subtipagens $T CD4^+$ e $T CD8^+$ em cães da raça Beagle recebendo dieta controle e suplementada com luteína por 120 dias.

Tratamento	Controle	Luteína	EPM	<i>P</i>
IPL	1,56	1,69	0,187	0,663
$CD4^+$	40,1 ^b	45,4 ^a	4,15	0,025
$CD8^+$	37,5 ^b	42,9 ^a	4,58	0,034

Os dados estão representados na forma de média \pm desvio padrão.

^{a,b} Médias seguidas por letras distintas diferem pelo teste t de Student ($P<0,05$).

4. DISCUSSÃO

4.1 Digestibilidade

A ausência de diferença estatística entre os resultados encontrados no presente experimento para a digestibilidade pode ter ocorrido pela baixa quantidade de luteína suplementada, podendo ser diferentes com concentrações maiores desse carotenóide. Em cães, não foi encontrado nenhum trabalho publicado para comparação dos resultados. Em humanos, estudos mostram que a luteína na forma de microemulsões, eficiente forma para absorção desta, pode reduzir problemas de digestibilidade e solubilidade, o que poderia auxiliar na

absorção de outros componentes dietéticos, como lipídeos. Esse fator viabiliza o emprego desse carotenóide principalmente em bebidas com características translúcidas (AMAR et al., 2004).

Os resultados de matéria seca fecal, quantidade e escore de fezes demonstram a viabilidade da inclusão da luteína na dieta para cães, já que esta não ocasionou problemas de fezes inconsistentes ou maior quantidade produzida.

4.2. Proliferação de linfócitos e contagem de T CD4⁺ e T CD8⁺

Estudando a ação dos carotenóides no sistema imune, pesquisas encontraram melhora na resposta imune em ratos, camundongos, e linfócitos em cultura (JYONOUCHI et al., 1994). Em outro estudo, BENDICH & SHAPIRO (1986), avaliando os resultados in vivo da luteína de extratos de tagetes em ratos, afirmam que este carotenóide, juntamente com outros como astaxantina, cantaxantina e β -caroteno, estimulam a resposta imunológica em geral dos animais.

Os resultados encontrados no presente experimento foram semelhantes aos de KIM et al. (2000a), em relação a estimulação na produção dos subtipos de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em cães. Os autores estudaram diferentes níveis de inclusão de luteína oralmente (0, 5, 10 e 20 mg), encontrando aumento significativo nestes subtipos após 8 semanas de suplementação com 5 a 20 mg. Entretanto, em relação ao índice de proliferação total de linfócitos, os autores encontraram aumento significativo após 12 semanas nos cães recebendo a dieta

com nível de 5 mg de inclusão, resultado este discrepante ao encontrado neste experimento, no qual os cães alimentados com luteína não diferiram em relação ao grupo controle.

Em estudo utilizando gatos, KIM et al. (2000b), avaliaram a suplementação de luteína e demonstraram que nestes animais a resposta é dependente da quantidade e do tempo de suplementação deste carotenóide. Os autores observaram aumento tanto da proliferação de linfócitos totais quanto da produção de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ após 4 semanas de suplementação. Portanto, a falta de diferença significativa entre os resultados deste experimento pode ter ocorrido pela quantidade baixa de luteína incluída na dieta teste.

Avaliando um extrato de marigold, rico em luteína, via oral por quatro semanas em camundongos, HOSKINSON et al. (1990) demonstraram aumento na proliferação de linfócitos após duas semanas de suplementação. A luteína provou, portanto, também ser capaz de estimular a proliferação de linfócitos induzida por mitógenos, resultado não encontrado no presente experimento (KIM et al., 2000a). Em experimento com ratos, a suplementação dietética com luteína reduziu o crescimento de tumores mamários transplantados e aumentou a proliferação de linfócitos (CHEW, 1995; CHEW et al., 1996; PARK et al., 1998).

Apesar da ausência de diferença estatística sobre os valores de proliferação, os resultados encontrados neste estudo sobre os linfócitos T comprovam o efeito benéfico imunomodulador da luteína, sendo um ingrediente em potencial a ser adicionado na dieta de cães.

5. CONCLUSÕES

A inclusão de luteína na dieta não altera a digestibilidade do alimento, características das fezes, parâmetros sanguíneos e o índice de proliferação de linfócitos em cães. Entretanto, eleva as concentrações dos subtipos de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, demonstrando a eficácia do efeito imunomodulador da luteína, fortalecendo saúde em geral desses animais.

REFERÊNCIAS

ALVES-RODRIGUES, A.; SHAO, A. The science behind lutein. **Toxicology Letters**, v.150, p. 57-83, 2004.

AMAR, I.; ASERIN, A.; GARTI, N. Microstructure transition derived from solubilization of lutein and lutein esters in food microemulsions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 33, p. 143-150, 2004.

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS – **AAFCO. Dog and cat nutrient profiles**. Official Publication of the Association of American Feed Control Officials Incorporated. AAFCO, Oxford, IN, USA, 2004.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAM CHEMISTS – **AOAC. Official Methods of Analysis**, 16th ed. AOAC, Washington, DC, USA, 1995.

BENDICH, A.; SHAPIRO, S.S. Effect of b-carotene and canthaxanthin on the immune response in rats. **Journal of Nutrition**, v.116, p.2254–2262, 1986.

CALDER, P. Nutrition and inflammatory. In: **Proceedings of the Nutrition Society**, v.67. Disponível em: <http://www.bmj.com/content/327/7407/117>. 2008.

CARCIOFI, A. C. Nutrição ótima para cães e gatos. **Clínica Veterinária**, v.47, p.72-78, 2003.

CHEW, B.P. Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. **Journal of Nutrition**, v.125, p.1804–1808, 1995.

CHEW, B.P.; WONG, M.W.; WONG, T.S. Effects of lutein from marigold extract on immunity and growth of mammary tumors in mice. **Anticancer Research**, v.16, p.3689-3694, 1996.

EDWARDS, R.P.; KUYKENDALL, K.; CROWLEY-NOWICK, P.; PARTRIDGE, E.E.; SHINGLETON, J.; MESTECKY, J. T lymphocytes infiltrating advanced grades of cervical neoplasia: CD8-positive cells are recruited to invasion. **Cancer**, v.76, p.1411-1415, 1995.

HOSKINSON, C.D.; CHEW, B.P.; WONG, T.S. Age-related changes in mitogen-induced lymphocyte proliferation and polymorphonuclear neutrophil function in the piglet. **Journal of Animal Science**, v.68, p.2471–2478, 1990.

JAIN N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger. 417p, 1993.

JYONOUCHI, H.; ZHANG, L.; GROSS, M.; TOMITA, Y. Immunomodulating actions of carotenoids: enhancement of in vivo and in vitro antibody production to T-dependent antigens. **Nutrition and Cancer**, v.21, p.47–58, 1994.

KEMIN FOODS L. C. Biolotus. **Diferenças químicas entre FloraGLO luteína e extrato de flores Tagetes erecta**. Rio de Janeiro, (Literatura Técnica), 1999.

KIM, H.W.; CHEW, B.P.; WONG, T.S.; PARK, J.S.; WENG, B.B.C.; BYERNE, K.M.; HAYEK, M.G.; REINHART, G.A. Dietary lutein stimulates immune response in the canine. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.74, p.315–327, 2000a.

KIM, H.W.; CHEW, B.P.; WONG, T.S.; PARK, J.S.; WENG, B.B.C.; BYERNE, K.M.; HAYEK, M.G.; REINHART, G.A. Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by dietary lutein in cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.73, p.331–341, 2000b.

KINDT, T.; GOLDSBY, R. **Kuby immunology**. 6ª edição. W. H. Freeman and Company, p.23-49, 2007.

LOURENÇO M.L.G. **Efeito da idade e da suplementação com luteína no hemograma, nas enzimas hepáticas, na glicemia e no proteinograma de neonatos felinos**. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2005.

MOTTA Jr., M. C. M. **Células do sistema imune**. 2005. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/celulas-do-sistema-imune-doc-a7675.html>> Acesso em: 25 de março, 2011.

NRC-Nutrient Requirements of Dogs, Report n° 8. **National Research Council**, Washington : National Academy of Sciences, 83p, 2006.

PARK, J.S.; CHEW, B.P.; WONG, T.S. Dietary lutein absorption from marigold extract is rapid in Balb/c mice. **Journal of Nutrition**, v.128, p.1802–1806, 1998.

STRINGHETA, P.C.; NACHTIGALL, A.M.; OLIVEIRA, T.T.; RAMOS, A.M.; SANTANA, H.M.; GONÇALVES, M.P. Luteína: propriedades antioxidantes e

benefícios à saúde. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v.17, n.2, p. 229-238, abr./jun, 2006.

VALDUGA, E.; TATSCH, P.O.; TIGGEMANN,, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenóides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Química Nova**, v.32, n.9, p.2429-2436, 2009.

WINTROBE, M. M. **Clinical Hematology**, 7th edition, 1278p. Lea and Febiger, Philadelphia, 1974.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os animais de companhia são em muitas ocasiões considerados membros da família e são tratados como tal. Isso implica que sua alimentação, além de conter uma quantidade de nutrientes correta, equilibrada e disponível, deve permitir otimizar sua saúde, atividade e longevidade. Buscando essa nutrição benéfica, o uso de alimentos funcionais vem demonstrando alto potencial de utilização na formulação de dietas para estes animais.

Os alimentos funcionais são todos os alimentos que buscam melhorar tanto a longevidade quanto a qualidade de vida dos animais. A quantidade, métodos e tempos de suplementação destes alimentos são os principais temas de novas pesquisas focando ampliar seu potencial de utilização. Além disso, a procura por novos alimentos e novas fontes dos já classificados como funcionais também são assuntos promissores nesta área. Dentre estes, a luteína tem se destacado por suas características benéficas já conhecidas e pelas novas descobertas com sua suplementação na dieta.

Benefícios importantes podem ser fornecidos pelo uso de ingredientes classificados como alimentos funcionais. A importância destes em melhorar a saúde é documentada tanto em humanos quanto em animais. Nestes, os carotenóides, principalmente a luteína, vêm demonstrando resultados promissores, devido principalmente ao seu papel imunomodulador e seu poder antioxidante.

Apesar da falta de resultados significativos em relação à digestibilidade, o uso da luteína em dietas para cães se mostra válido, já que esta demonstrou ter

efeitos positivos na saúde em geral dos animais, ao atuar nas respostas específicas contra antígenos. Os dados deste trabalho demonstram que é necessário realizar outras etapas deste estudo, utilizando outras doses de luteína na dieta e tempos diferentes de suplementação. Assim, conseguiremos demonstrar qual é a dose indicada e correta, além do tempo necessário para que a luteína possa atuar benéficamente no organismo dos animais.

Além dos efeitos benéficos ao sistema imune, pesquisas utilizando doses maiores e por períodos prolongados devem ser realizadas para que haja dados suficientes sobre os efeitos dessa suplementação na digestibilidade dos animais.

